

Maunx 1964

ÜBER DIE ABHÄNGIGKEIT DER ERYTHROPOETINAKTIVITÄT DES BLUTES
VOM SCHWEREGRAD DER ANÄMIE
NACH PHENYLHYDRAZIN-HÄMOLYSE BEIM KANINCHEN

von

MARCO CLAYTON



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ÜBER DIE ABHÄNGIGKEIT DER ERYTHROPOETINAKTIVITÄT DES BLUTES
VOM SCHWEREGRAD DER ANÄMIE
NACH PHENYLHYDRAZIN-HÄMOLYSE BEIM KANINCHEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

MARCO CLAYTON

aus New York

MAINZ 1962

Dekan: Prof. Dr. H. Bredt
Referent: Priv. Doz. Dr. L. Friederici
Korreferent: Prof. Dr. R. Duesberg
Tag der mündl. Prüfung: 3. Februar 1964



EINLEITUNG

Nach der Geburt ist die Blutbildung beim Säuger unter physiologischen Bedingungen auf das Knochenmark beschränkt. Die Zahl der roten Blutkörperchen und der Blutplättchen ist relativ konstant, während die Leucocytenwerte stärkeren Schwankungen unterworfen sind. Bereits kurz nach der Jahrhundertwende wurde vermutet, daß die Bildung, Reifung und Ausschwemmung der roten Blutzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut im wesentlichen durch einen humoralen Faktor gesteuert werden, der bei vermindertem Sauerstoffgehalt des Blutes und des Gewebes vermehrt gebildet werden soll und so eine reaktive Steigerung der Erythropoese bei Blutverlusten und Sauerstoffmangelzuständen bewirkt. Der Nachweis dieses spezifischen erythropoetischen Wirkstoffs wurde zuerst von CARNOT und DEFLANDRE versucht. Die genannten Autoren teilten 1906 mit, daß mit dem Plasma anämischer Kaninchen nach intravenöser Injektion bei normalen Kaninchen eine Vermehrung der Erythrocyten um 1 Million und mehr erzielt werden kann. Die im Plasma der anämischen Versuchstiere vermutete wirksame Substanz wurde als "Hämopoetin" bezeichnet, deren Existenz im Laufe der folgenden Jahrzehnte teils anerkannt, teils erheblich in Frage gestellt wurde.

Es ist das Verdienst von RUHENSTROTH-BAUER, wesentliche Untersuchungen zur Klärung der mitgeteilten, voneinander abweichenden Versuchsergebnisse beigetragen zu haben. Es ergab sich, daß eine Drosselung der Sauerstoffversorgung des Organismus stets zu einer Steigerung der Erythropoese führt, wobei es gänzlich gleichgültig ist, ob der Sauerstoffgehalt der Luft vermindert wird, die Atemfläche der Lungen plötzlich verkleinert wird oder die Zahl der Erythrocyten herabgesetzt ist. Unabhängig von diesen Untersuchungen gelang es REISSMANN 1950, im Parabioseversuch bei Ratten durch Erniedrigung des O_2 -Gehaltes der Atemluft des einen Partners eine Steigerung der Erythropoese bei beiden Parabiosetieren nachzuweisen, die nur durch einen humoralen Wirkstoff ausgelöst worden sein konnte. Nachdem durch diese Untersuchungen der erythropoetisch wirksame Faktor im Blut gesichert erschien, gewann der Wirkstoff, der nach BONSDORFF u. JALAVISTO als Erythropoetin bezeichnet wird, erneut an Interesse.

Trotz intensiver Bemühungen verschiedener Arbeitsgruppen ist er bisher noch nicht rein dargestellt worden, noch ist endgültig geklärt, ob es sich um mehrere oder nur um eine einzige Substanz handelt. LINMAN u. BETHELL glaubten, zwei verschiedene Faktoren nachweisen zu können, von denen der eine hitzestabil und ätherlöslich, der andere thermolabil und in Äther unlöslich

sein soll. Die hitzestabile Fraktion sei für die Erythroblastenproliferation verantwortlich, während der thermolabile Faktor eine Steigerung der Hämoglobinsynthese bewirken soll. Nachuntersucher konnten diese Befunde jedoch nicht bestätigen.

Der Nachweis der Erythropoetins ist bisher nur im biologischen Test möglich. Da die nach Injektion erythropoetinhaltigen Plasmas bzw. Serums auftretende Retikuloctensteigerung zu starke Schwankungen aufwies und zentral-nervöse Einflüsse nicht auszuschließen waren, wurde von FRIEDERICI die Testung an der Knochenmarkkultur im hängenden Tropfen vorgenommen, wobei die Vermehrung der Erythroblasten im Vergleich zu den mit Normalserum angesetzten Kontrollkulturen des gleichen Knochenmarks als Maß für die Erythropoetinaktivität angesehen wurde. Zuverlässige Ergebnisse wurden an der hypophysektomierten Ratte erzielt, deren Erythropoese durch den Verlust der Hypophyse fast vollständig gehemmt wird. Die nach Injektion von erythropoetinhaltigem Serum erfolgende Steigerung der Erythropoese kann mittels Inkorporation von Fe^{59} in die roten Blutzellen exakt gemessen werden. In ähnlicher Weise wird auch im Hungerzustand bzw. nach wiederholten Transfusionen die Erythropoese der Versuchstiere gedrosselt (JACOBSON u. Mitarb., PRENTICE u. MIRAND).

Es wird heute von den meisten Autoren angenommen, daß die Erythropoetinbildung im wesentlichen durch das Verhältnis von Sauerstoffangebot zum Sauerstoffbedarf der Gewebe bestimmt wird. Bei vermehrter Erythropoetinproduktion erfolgt eine Steigerung der Erythropoese durch Differenzierung der Stammzellen im Erythroblasten. Nach entsprechender Reifungszeit von etwa vier Tagen manifestiert sich diese im peripheren Blut durch einen Anstieg der Retikuloctenwerte. Umgekehrt ist bei Verminderung der Erythropoetinaktivität ein Absinken der Retikulocten im peripheren Blut zu erwarten. In gleichem Sinne müßte sich auch die Erythropoese im Knochenmark verhalten. Dieser Regulationsmechanismus könnte also als eine Antwort des Körpers auf den Mangel des für jede Zelle lebensnotwendigen Sauerstoffs betrachtet werden, dessen Transportvehikel die Erythrocyten sind. Der genaue Wirkungsmechanismus dieser Steuerung ist noch unbekannt. Es wird angenommen, daß ein spezifisches sauerstoffempfindliches Gewebe die Bildung des erythropoetischen Wirkstoffs reguliert, der seinerseits wiederum die Erythropoese im Knochenmark beeinflußt. Der Ort der Erythropoetinbildung ist noch nicht sicher bekannt. Es wird jedoch von JACOBSON, NAETS u. a. vermutet, daß der Wirkstoff in der Niere gebildet oder aktiviert wird.

Normalerweise vollzieht sich die Hämatopoese beim ausgewachsenen Säuger ausschließlich im Mark der Wirbel, Rippen, Schulterblätter, des Brustbeins,

Schädels und Beckens sowie in den proximalen Enden von Humerus und Femur. Im Bedarfsfalle kann sich jedoch das Volumen des blutbildenden Markes unter Verdrängung des Fettmarkes in den langen Röhrenknochen vergrößern, so daß sich der Organismus an die jeweiligen Erfordernisse anpassen kann. Hieraus erklärt sich das gute und-rasche Reaktionsvermögen des Markorgans auf die verschieden starken hämatopoetischen Reize.

Erythropoetin bewirkt nach den bisherigen Beobachtungen eine Umwandlung der Stammzellen in Proerythroblasten. Eine gleichzeitige Beschleunigung der Erythroblastenreifung konnte nicht nachgewiesen werden. Als Stammzelle der Erythropoese ist nach DUESBERG, FRESEN u. TISCHENDORF die mesenchymale Retikulumzelle anzusehen, die bei gesteigerter Erythropoese häufig im Zentrum der Erythroblastennester anzutreffen ist. Sie ist dann im Gegensatz zur undifferenzierten Retikulumzelle bereits scharf begrenzt und angerundet. Ihr Durchmesser ist deutlich größer als der eines Proerythroblasten. Der große, lockere nucleolenhaltige Kern ist von einem hellblauen Cytoplasma umgeben und zeigt gelegentlich Übergänge zur Kernstruktur des Proerythroblasten. Der Durchmesser der Proerythroblasten schwankt zwischen 12 bis 15. Ihr relativ großer und lockerer Kern enthält mehrere Nucleolen, die oft nur schwer erkennbar sind. Das dunkelblaue Cytoplasma läßt vielfach um den Kern eine schmale Aufhellungszone erkennen. Im Vergleich zum Myeloblasten und Lymphoblasten ist das Cytoplasma homogener und dichter. Durch Reifeteilung entsteht aus dem Proerythroblasten der Makroblast, dessen Kern kleiner ist, keine Nucleolen enthält und durch die Anordnung des Chromatins oft radspeichenartiges Aussehen erhält. Den Hauptanteil der Erythroblasten bilden die Normoblasten, deren Cytoplasma meist polychromatisch oder oxyphil ist. Mit zunehmender Reifung wird der Kern grobschollig und schließlich pyknotisch. Ob sich die Entkernung durch Kernaussstoßung oder intracelluläre fermentative Kernauflösung vollzieht, ist noch nicht endgültig geklärt. ROHR, PAPPENHEIM, NAEGELI u.a. halten die Karyolyse für die physiologische Form der Entkernung, während ALBRECHT, MAXIMOW, SCHILLING u. VOIT eine Ausstoßung der pyknotischen Kerne annehmen.

Die nach der Entkernung des Normoblasten entstehende Zelle unterscheidet sich vom reifen Erythrocyten durch bestimmte färberische Eigenschaften. Da sich mit Vitalfarbstoff - am gebräuchlichsten ist Brillantkresylblau - ein Netzwerk, die Substantia reticulofilamentosa, nachweisen läßt, wurde ihnen der Name Retikulocyten gegeben. Paul EHRlich entdeckte diesen Zelltyp vor 80 Jahren und hielt ihn für eine Degenerationsform. Spätere Untersuchungen (Theobald SMITH, CESARIS-DEMEL, WIDAL, SCHILLING, SEY-

FARTH, NAEGELI u. a.) erkannten übereinstimmend das Auftreten der Retikulo-
cyten im peripheren Blut als Regenerationszeichen an. Die vitalfärbbare Sub-
stanz entstammt dem Cytoplasma und gehört chemisch zu den Ribosenucleo-
tiden (DUSTIN; LAVES u. THOMA). Bei panoptischer Färbung nach PAPPEN-
HEIM ist sie für die Polychromasie der Erythrocyten verantwortlich. Die Re-
aktion des Farbstoffs Brillantkresylblau mit der Ribonucleinsäure des Retikulo-
cyten gilt nach den Untersuchungen von COUTELLE, RAPOPORT u. LINDIG-
KEIT als hochspezifisch. Übereinstimmend mit HEILMEYER u. TRACHTEN-
BERG sieht FRIEDRICI 3 bis 15‰ beim gesunden Menschen als normal an.
Für Kaninchen und Mäuse liegen die Werte bei 10 bis 20 ‰. Die morphologi-
schen Unterschiede des Netzwerkes veranlaßten HEILMEYER zu einer Untertei-
lung in 5 Reifungsstadien. Gruppe 0 umfaßt die kernhaltigen Retikulo-
cyten (= reife Normoblasten), bei denen die vitalfärbbare Substanz den pyknotischen
Kern als dichtes Netzwerk umgibt. Bei den Zellen der Gruppe I findet sich
im Zentrum ein dichter Knäuel, der aus einem dichten Fadennetzwerk mit
eingelagerten Granulis besteht (Knäuelform). In den Zellen der Gruppe II
hat sich die basophile Substanz als lockeres Netz über den ganzen Retikulo-
cyten verteilt (Netzform), das bei der Gruppe III bereits in Auflösung begrif-
fen ist (unvollständige Netzform). Die Zellen der Gruppe IV (Körnchenform)
enthalten nur noch wenige Körnchen in der Peripherie. Regelmäßig finden sich
die Retikulo-
cyten der Gruppe III und IV im Blut gesunder Säuger, während die
unreiferen Formen nur bei Zuständen gesteigerter Erythropoese aus dem Kno-
chenmark in der periphere Blut ausgeschwemmt werden. Hier verliert der Re-
tikulo-
cyt seine spezifische Färbbarkeit und erfüllt als reifer Erythrocyt mit ei-
ner Lebensdauer von 120 Tagen seine Hauptaufgabe, Transportvehikel für den
Sauerstoff zu sein. Hierzu sind die roten Blutkörperchen durch ihren hohen
Gehalt an Blutfarbstoff und eine Vielzahl von Fermenten besonders geeignet.

Der altersbedingte Abbau, der mit einer Verminderung der Fermentaktivität
des roten Blutkörperchens vergesellschaftet ist, wird unter normalen Bedingun-
gen durch eine kontinuierliche Neubildung roter Blutzellen voll kompensiert.
Sinkt die Erythrocytenzahl durch Blutverluste oder hämolytische Prozesse ab,
so erfolgt reaktiv eine Steigerung der Erythropoese im Knochenmark, die so
lange anhält, bis der normale Erythrocytenbestand wieder erreicht ist. An der
Steuerung dieser Proliferationssteigerung ist der Wirkstoff Erythropoetin maß-
geblich beteiligt, der sich bei mittel- bis stärkergradigen Anämien im Serum
vermehrt nachweisen läßt. Nicht immer entspricht jedoch die Erythropoetin-
aktivität dem Grad der Anämie. GURNEY, JACOBSON u. GOLDWASSER war
aufgefallen, daß bei Patienten mit hypo- bzw. aplastischer Anämie, also
bei einer Verminderung der Erythroblasten im Knochenmark, die erythropoeti-

sche Aktivität des Plasmas am größten war. Es erhebt sich somit die Frage, ob das Erythropoetin bei gesteigerter Erythropoese von den Erythroblasten vermehrt verbraucht wird und aus diesem Grunde bei aplastischer bzw. hypoplastischer Anämie im Blut besser nachzuweisen ist als bei Anämien mit guter Regeneration.

Ziel und Zweck der vorliegenden Arbeit ist es, beim Kaninchen durch gleichzeitige Untersuchung des Blut- und Knochenmarkbildes sowie der Erythropoetinaktivität zu prüfen, welche Relationen zwischen dem Grad der Anämie und der Erythropoese Steigerung im Knochenmark einerseits und der erythropoetischen Aktivität des Serums andererseits bestehen.

METHODIK

Als Versuchstiere dienten Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 2,5 bis 3 kg. 20 Tiere erhielten an 3 aufeinander folgenden Tagen 5 ml einer 1%-igen Phenylhydrazinlösung. Die Injektionen wurden paravertebral unter die Rückenhaut vorgenommen. Am 4. Tage und an jedem der darauffolgenden Tage wurden jeweils 2 Kaninchen zur Untersuchung getötet. Ein Kaninchen, das statt Phenylhydrazin physiologische Kochsalzlösung bekommen hatte, diente als Kontrolle. Unmittelbar vor dem Tod der Tiere wurden Hämoglobin, Erythrocyten und Leucocyten bestimmt und Retikuloeytenzählungen nach Vitalfärbung der Blutausstriche mit Brillantkresylblau vorgenommen. Die Untersuchungen erfolgten jeweils in Doppelbestimmungen. Zur Erzielung einer tiefen Narkose wurden 5 ml einer 5%-igen Evipanlösung in die Ohrvene injiziert. Nach Eröffnung des Brustkorbes wurden durch Herzpunktion 30 bis 40 ml Blut gewonnen und nach erfolgter Gerinnung das Serum abzentrifugiert, eingefroren und in der Tiefkühltruhe bis zum Testen aufbewahrt.

Vom Knochenmark des linken Oberschenkels wurden aus dem Bereich der proximalen und distalen Epiphyse und aus der Diaphyse Tupfpräparate angefertigt, die nach PAPPENHEIM gefärbt wurden. Die Auszählung erfolgte wie bei Sternalpunktaten nach dem von ROHR angegebenen Schema, wobei die Erythroblasten jeweils auf 100 weiße Knochenmarkzellen bezogen wurden.

Die Testung der Erythropoetinaktivität wurde an der polycythämischen Maus durchgeführt. Insgesamt wurden 120 weiße weibliche jugendliche Mäuse

durch intraperitoneale Injektion gewaschener Mäuseerythrocyten polycythämisch gemacht. Als Spender dienten ausgewachsene Mäuse des gleichen Stammes, die in Äthernarkose entblutet wurden. Nach 3-maligem Waschen der Erythrocyten mit physiologischer Kochsalzlösung wurde den Testtieren an 4 aufeinanderfolgenden Tagen 0,5 ml Erythrocytensuspension injiziert. Die Mäuse wurden in 20 Gruppen zu je 6 Tieren aufgeteilt und erhielten vom 7. bis zum 10. Tag 0,5 ml Kaninchenserum. Außerdem wurde am 7. und 9. Tag nochmals 0,5 ml Erythrocytensuspension injiziert. Am 7. und 11. Tage wurden aus dem Schwanzblut Ausstriche zur Retikuloeytenzählung angefertigt und mehrfach Mikrohämatokritbestimmungen durchgeführt, die einen Anstieg auf 70% erkennen ließen. Zur Kontrolle wurde einer Gruppe von 6 Mäusen, die in gleicher Weise vorbehandelt wurden, normales Kaninchenserum injiziert.

Schema der Injektionen

1. Tag	0,5 ml	Erythrocytensuspension intraperitoneal
2. Tag	0,5 ml	Erythrocytensuspension intraperitoneal
3. Tag	0,5 ml	Erythrocytensuspension intraperitoneal
4. Tag	0,5 ml	Erythrocytensuspension intraperitoneal
7. Tag	0,5 ml	Erythrocytensuspension intraperitoneal
	0,5 ml	Kaninchenserum subkutan
8. Tag	0,5 ml	Kaninchenserum subkutan
9. Tag	0,5 ml	Erythrocytensuspension intraperitoneal
	0,5 ml	Kaninchenserum subkutan
10. Tag	0,5 ml	Kaninchenserum subkutan

Ergebnisse

1) Das Verhalten von Erythrocyten, Hämoglobin und Leucocyten nach Phenylhydrazininjektion

Nach Injektion von je 5 ml einer 1%-igen Phenylhydrazinlösung an 3 aufeinanderfolgenden Tagen war eine deutliche Anämie bei den Versuchstieren vorhanden, die etwa 4 Tage konstant blieb und sich vom 5. bis 10. Tag nach der letzten Phenylhydrazininjektion mit dem allmählichen Ansteigen der Erythrocyten- und Hämoglobinwerte besserte. Tabelle 1 gibt das Verhalten des Hämoglobins, der Erythrocyten und Leucocyten der anämisch gemachten Kaninchen wieder. Tabelle 1a enthält die Mittelwerte der jeweils am gleichen Tag getöteten Tiere. Abbildung 1 läßt sehr gut das Ansteigen des Hämoglobinspiegels nach Beendigung der Phenylhydrazininjektion erkennen, wobei am 10. Tag

Tabelle 1

Tag	Kan.	Hb g%	Ery. Mill.	Leuco
1	21	5,98	1,32	12,200
	22	6,52	2,05	31,700
2	23	4,78	1,10	5,600
	24	7,04	2,25	8,400
3	25	7,08	2,44	6,800
	26	5,60	1,22	5,300
4	27	8,68	2,07	4,500
	28	3,90	1,70	5,900
5	29	8,64	2,44	5,000
	30	8,17	2,84	11,400
6	31	7,98	2,80	2,900
	32	6,28	2,06	2,800
7	33	9,36	3,06	5,400
	34	9,50	4,18	9,300
8	35	10,00	3,56	8,900
	36	11,30	4,77	5,500
9	37	10,68	4,07	7,400
	38	9,14	4,01	6,600
10	39	11,97	6,37	7,100
	40	11,97	4,47	7,300

Blutwerte nach Phenylhydrazinsuspension

Tabelle 1a

Tag	Ery. Mill.	Hb. g%	Tag	Ery. Mill.	Hb. g%
1	1,68	6,25	7	3,62	9,48
2	1,67	5,91	8	4,16	10,65
3	1,83	6,34	9	4,04	9,91
4	1,88	6,29	10	5,42	11,97
5	2,64	8,40	x	5,60	12,00
6	2,43	7,63	(x = Kontrolle)		

Mittelwerte der Tabelle 1

der Hämoglobinwert mit 11,97 g% am höchsten lag. Die Differenzen, die sich trotz Doppelbestimmung bei den am gleichen Tag getöteten Versuchstieren ergaben, sind nicht methodisch bedingt, sondern müssen auf die relativ große Schwankungsbreite des Blutbildes beim Kaninchen bezogen werden. Trotz dieser Schwankungen lassen jedoch Tabelle 1 und Abbildung 1 eindeutig einen Anstieg der Hämoglobinwerte nach Beendigung der Phenylhydrazinhämolyse erkennen.

Abbildung 2 zeigt das Verhalten der Erythrocyten nach Phenylhydrazininjektion. Auch hierbei ergibt sich, daß die Anämie unmittelbar nach der durch Phenylhydrazin ausgelösten Hämolyse am stärksten ausgeprägt war und vom 5. bis 6. Tag an von einem raschen Ansteigen der Erythrocyten gefolgt wird. Werden die Erythrocytenwerte zu den jeweiligen Hb-Werten des betreffenden Tieres in Relation gesetzt (Abb.3), so läßt sich ein gleichsinniges Verhalten feststellen, ein Befund, der darauf hinweist, daß mit Einsetzen der Regeneration sowohl die Erythroblastenproliferation als auch die Blutfarbstoffsynthese stimuliert werden.

2) Das Verhalten der Retikulocyten nach Phenylhydrazinhämolyse

Die Zählung der Retikulocyten wurde im Ausstrichpräparat in der üblichen Weise vorgenommen. Die mit Brillantkresylblau gefärbte Substantia reticulofilamentosa war gut von den durch die Phenylhydrazineinwirkung entstandenen Innenkörpern abzugrenzen. Alle Zellen mit groben Farbstoffpartikeln, die kein feines Netz aufwiesen, wurden bei der Auswertung ausgeschlossen und nicht als Retikulocyten ausgezählt. Pro Präparat wurden 1000 Zellen ausgewertet und die Zahl der Retikulocyten in Promille (‰) angegeben. Tabelle 2 enthält die Retikulocytenwerte pro Tier. Tabelle 2a gibt die Mittelwerte der jeweiligen Versuchsgruppe wieder. Es zeigt sich, daß unmittelbar nach Beendigung der Phenylhydrazinvorbehandlung die Retikulocytenwerte am höchsten liegen und im Lauf der folgenden 10 Tage kontinuierlich absinken. Der Höchstwert betrug 700 ‰, der niedrigste wurde mit 75 ‰ am 10. Tag erreicht.

Da das Verhalten der Retikulocytenwerte bekanntlich den Zustand der Erythropoese charakterisiert und am peripheren Blut erkennen läßt, ob eine Steigerung der Erythrocytenproduktion besteht, ist zu erwarten, daß sich nach eingetretener Retikulocytose mit zunehmender Ausreifung der Retikulocyten zu normalen roten Blutkörperchen die Werte der Retikulocyten zu denen der Ery-

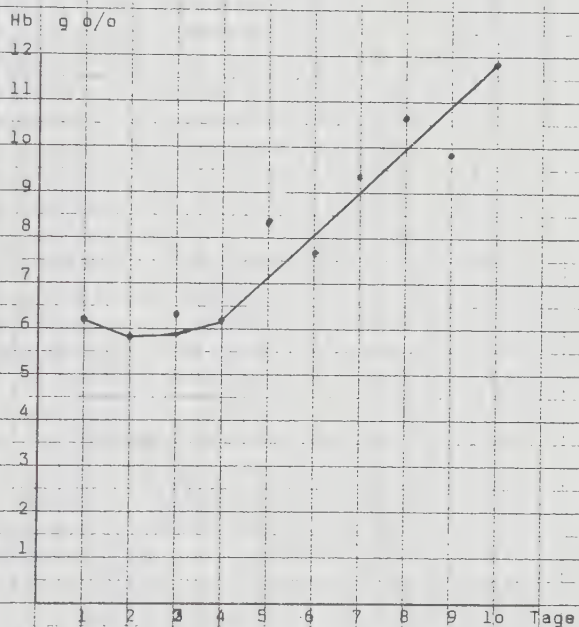


Abb. 1: Verhalten der Hämoglobinwerte
nach Phenylhydrazinhämolyse.

Erythrocyten

Mill.

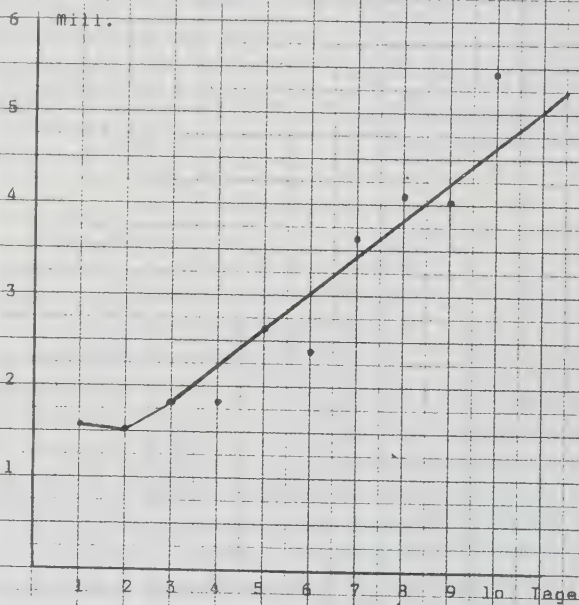


Abb. 2: Verhalten der Erythrocytenwerte
nach Phenylhydrazinämolyse.

Nb g o/o

12

11

10

9

8

7

6

5

1

2

3

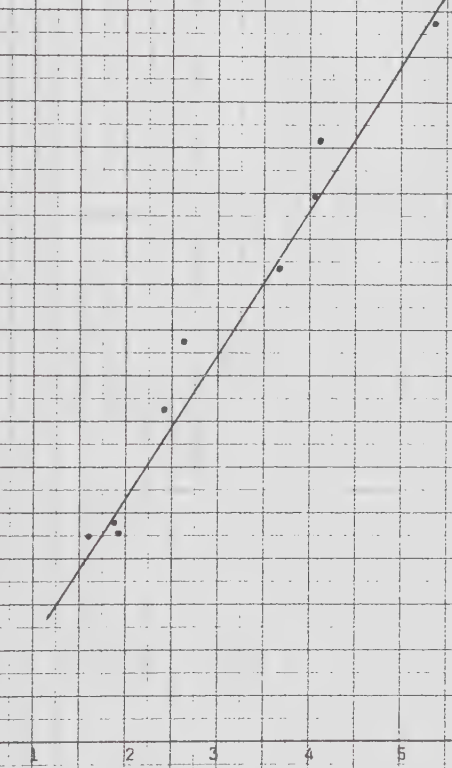
4

5

6

Millionen Erythrocyten

Abb. 3: Verhalten der Erythrocyten-
zu den Hämoglobinwerten



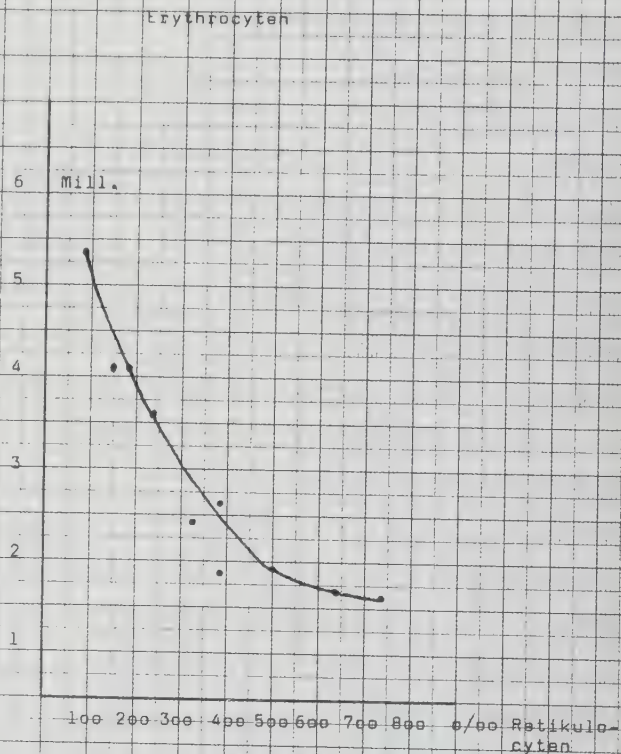


Abb. 4: Relation der Erythrocyten zu den Retikulo-cyten

Tabelle 2

Tag	Kan.	Reticuloc. ‰	Tag	Kan.	Reticuloc. ‰
1	21	650	6	31	330
	22	640		32	340
2	23	700	7	33	250
	24	550		34	230
3	25	560	8	35	200
	26	440		36	180
4	27	340	9	37	190
	28	400		38	140
5	29	360	10	39	120
	30	380		40	75

Reticulocytenwerte nach Phenylhydrazinhämolyse

Tabelle 2 a

Tag	Reticuloc. ‰
1	645
2	625
3	500
4	370
5	370
6	335
7	240
8	190
9	165
10	97

Mittelwerte der Reticulocyten nach Phenylhydrazinhämolyse

thocyten umgekehrt proportional verhalten. Abbildung 4 zeigt, daß tatsächlich mit Absinken der Reticulocyten eine Zunahme der Erythrocyten erfolgt.

Das Verhalten des Knochenmarkes bei Phenylhydrazinanämie

Um einen Einblick in die Erythropoese nach Phenylhydrazinhämolyse zu bekommen, wurden nach Tötung der Versuchstiere Tupfpräparate vom Knochenmark des linken Oberschenkels angefertigt, und zwar je 2 Präparate aus dem Mark der proximalen und distalen Epiphyse sowie der Diaphyse. Von jedem Präparat wurden die Erythroblasten, bezogen auf 200 weiße Knochenmarkzellen, ausgezählt und die Mittelwerte hiervon errechnet.

Tabelle 3 enthält die Mittelwerte der roten Knochenmarkzellen pro 100 weiße Zellen eines jeden Versuchstieres, während Tabelle 3 a das Gruppenmittel der an den verschiedenen Tagen getöteten Kaninchen wiedergibt. Wie die erhöhten Reticulocytenwerte in den ersten Tagen nach der durch Phenylhydrazin ausgelösten Hämolyse vermuten ließen, war im Knochenmark eine erhebliche Steigerung der Erythropoese feststellbar, die anfangs eine deutliche Linksverschiebung aufwies. Bei insgesamt erhöhten Erythroblastenwerten (siehe Tabelle 4 und 4a) waren in den ersten Tagen die Proerythroblasten und Makroblasten vermehrt. Später betraf die Zunahme der Erythroblasten vorwiegend die reiferen Stufen. Als die Anämie der Versuchstiere geringer wurde und somit vermutlich auch der Erythropoetinspiegel abgesunken war, fielen auch die erhöhten Werte der Erythroblasten sowie der Reticulocyten ab und lagen am 10. Tag nur noch gering über dem oberen Normalbereich. Wie die Abbildung 3 erkennen läßt, besteht eine deutliche Korrelation zwischen Erythroblasten und Reticulocytenwerten. Beide Zellformen spiegeln in ihrem Verhalten die Aktivität der Erythropoese und können als Maß für den Erythropoetiningehalt des Blutes angesehen werden.

Tabelle 3

Kan.	Lymphoide Retik.	Proerythro- blasten	Makro- blasten	Basoph. Normobl.	Polychr. Normobl.	Oxyphil. Normobl.
21	3,0	3,8	28,1	42,0	23,5	15,5
22	2,1	4,6	20,8	50,5	23,8	15,3
23	1,3	1,1	10,3	25,5	17,6	12,8
24	1,5	1,1	12,6	39,5	24,8	14,0
25	2,5	1,3	11,6	28,6	19,8	18,8
26	1,0	4,0	24,5	37,8	16,8	8,6
27	1,0	0,6	6,5	70,1	26,5	17,5
28	2,0	3,5	15,6	46,5	20,8	15,6
29	1,3	0,1	2,5	20,3	20,0	16,3
30	1,6	2,0	7,0	31,5	17,1	20,3
31	2,1	1,6	9,6	38,0	17,1	10,6
32	1,0	0,6	7,6	28,8	19,3	12,6
33	1,0	2,0	7,4	26,0	19,1	13,8
34	1,0	1,3	10,7	28,0	20,6	18,6
35	0,5	---	2,6	27,3	21,0	19,1
36	0,8	0,8	4,8	25,3	15,1	18,0
37	1,3	0,8	4,8	24,6	14,8	14,3
38	1,5	0,5	4,7	10,5	14,6	10,6
39	0,5	0,1	1,3	9,8	16,0	13,1
40	0,1	0,5	2,6	13,1	10,8	11,1

Knochenmarkerythroblasten pro 100 weiße Zellen

Tabelle 3a

Tag	Lymphoide Retik.	Proerythro- blasten	Makro- blasten	Basoph. Normobl.	Polychr. Normobl.	Oxyph. Normobl.
1	2,5	4,2	24,5	46,2	23,6	15,4
2	1,4	1,1	11,4	32,5	22,7	13,4
3	1,7	2,6	18,1	33,1	18,3	13,7
4	1,5	2,0	11,0	58,3	23,6	16,6
5	1,4	1,0	4,7	25,7	18,6	18,3
6	1,5	1,1	8,6	33,4	18,6	11,6
7	1,0	1,6	9,2	27,0	19,8	16,3
8	0,7	0,8	3,7	26,3	18,1	18,5
9	1,4	0,7	4,8	17,5	14,7	12,4
10	0,3	0,3	2,0	11,5	13,4	12,1

Mittelwerte der Tabelle 3

Tabelle 4

Kan.	Erythroblast. ⁺	Kan.	Erythroblast. ⁺
21	112,9	31	76,9
22	115,0	32	68,9
23	67,3	33	68,3
24	91,9	34	79,2
25	80,1	35	70,0
26	91,7	36	64,0
27	121,2	37	59,3
28	102,0	38	40,9
29	59,2	39	40,3
30	77,9	40	38,1

Erythroblastengesamtwerte nach Phenylhydrazinhämolyse

⁺ Erythroblasten pro 100 Granulocyten (weiße Zellen)

Retikulocyten

o/oo

900

850

800

750

700

650

600

550

500

450

400

350

300

250

200

150

100

50

10

20

30

40

50

60

70

80

90

100

110

120

Erythro-
blasten

Abb. 5. Relation der Erythroblasten - zu den
Retikulocytenwerten

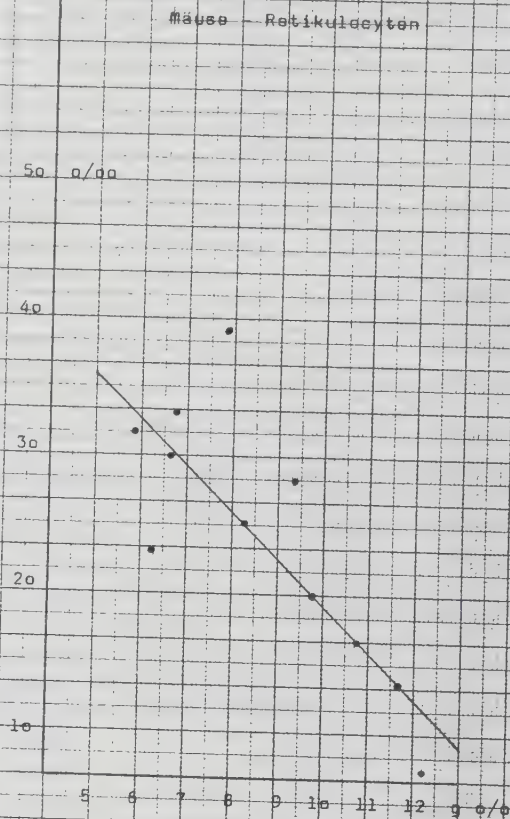


Abb. 5: Verhalten der Mäuse - Retikulocyten nach Injektion des Serums der anämischen Kaninchen in Abhängigkeit vom Hämoglobingehalt.

Mäuse - Retikulozyten

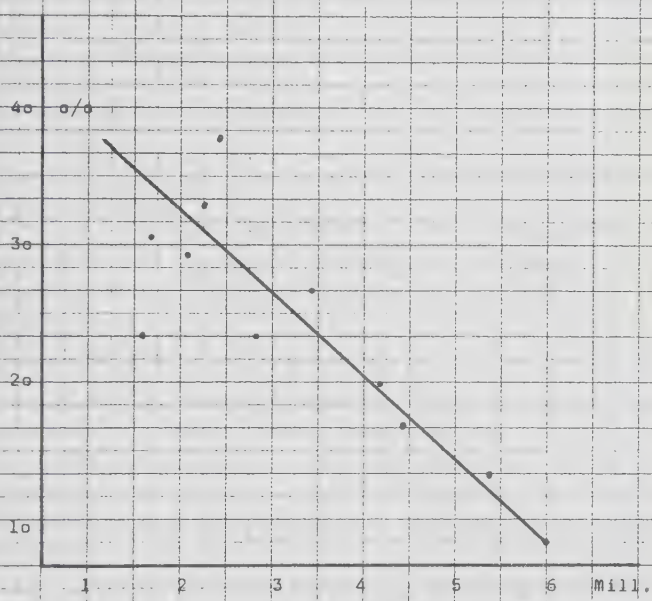


Abb.7: Verhalten der Mäuse-Retikulozyten nach Infektion des Serums der anämischen Kaninchen in Abhängigkeit von den Erythrocytenwerten.

Mäuse - Retikulozyten

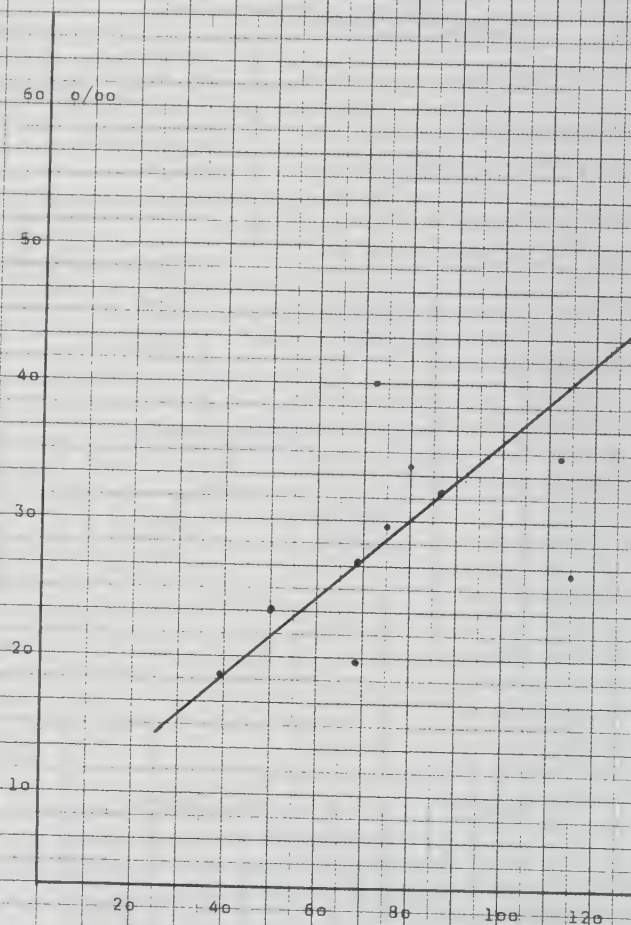


Abb. 8: Kaninchen - Erythroblasten
pro 100 Granulozyten

Tabelle 4a

Tag	Erythroblast. ⁺	Tag	Erythroblast. ⁺
1	113,9	6	72,9
2	80,0	7	73,8
3	85,9	8	67,0
4	111,6	9	49,9
5	68,6	10	39,1

Mittelwerte der Tab.4

⁺ Erythroblasten pro 100 Granulocyten

4) Die Wirkung des Serums anämischer Kaninchen auf die Retikuloocyten der polycythämischen Maus

Nachdem die Mäuse durch intraperitoneale Erythrocyteninjektionen nach dem angegebenen Schema polycythämisch gemacht worden waren, wobei der Hämatokrit aus 65 bis 70% anstieg, wurde an ihnen die Testung des Serums der durch Phenylhydrazin anämisch gemachten Kaninchen durchgeführt. Die Mäuse erhielten an 4 aufeinanderfolgenden Tagen je 0,5 ml Kaninchenserum subkutan. Vor Beginn der Seruminjektionen wurden aus dem Schwanzblut Retikuloocytenausstriche angefertigt, die infolge der durch Erythrocytentransfusion induzierten Polycythämie keine oder nur vereinzelt vitalgranulierte Zellen erkennen ließen. Nach der Injektion des Anämieserums war demgegenüber ein deutlicher Anstieg der Retikuloocytenwerte feststellbar, während normales Kaninchenserum nur eine geringgradige Erhöhung bewirkte (Tab.5). Beim Vergleich der Mäuseretikuloocytenwerte nach Injektion des Kaninchenserums mit dem Erythrocyten- bzw. Hämoglobingehalt des betreffenden Kaninchens ergibt sich eine annähernd lineare Korrelation (Tab.6 u. 7). In ähnlicher Weise besteht eine Abhängigkeit von den Erythroblastenwerten (Abb.8). Das Serum der Kaninchen mit Vermehrung der Knochenmarkerythroblasten besitzt eine erhöhte Erythropoetinaktivität und löst demzufolge bei der polycythämischen Maus einen stärkeren Anstieg der Retikuloocyten aus als das Serum der Kaninchen, deren Knochenmark nach Besserung der Anämie nur noch eine geringgradige Steigerung der Erythropoese erkennen läßt.

Tabelle 5

Kan.-Serum	Mäuse-Retikulocyten ‰	
	vor Serum-Inj.	nach Serum-Inj.
21	2,4	25,3
22	0,0	27,3
23	0,7	40,7
24	0,8	26,0
25	0,5	23,0
26	0,0	40,0
27	0,6	26,0
28	0,2	40,2
29	1,2	27,0
30	1,0	25,0
31	0,0	27,0
32	0,6	54,0
33	0,0	32,0
34	0,4	25,0
35	1,0	20,0
36	2,0	18,0
37	0,3	24,0
38	1,0	21,0
39	0,0	16,0
40	0,2	17,2
x	0,0	9,0

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Es konnte eindeutig werden, daß Phenylhydrazin bei den Versuchstieren eine schwere Anämie ausgelöst hat. Hämoglobin und Erythrocytenwerte blieben bis zum 4. Tag nach der letzten Phenylhydrazininjektion annähernd konstant und stiegen vom 5. bis 10. Tag deutlich an, wobei sich Erythrocyten und Hämoglobin einander proportional verhielten.

Die Retikuloeyten waren unmittelbar nach Beendigung der Phenylhydrazininjektionen am stärksten angestiegen und sanken mit zunehmender Erhöhung der Erythrocytenwerte kontinuierlich ab.

Das Knochenmark zeigte eine Proliferationssteigerung der Erythropoese mit deutlicher Zunahme der unreifen Erythroblasten nach der Phenylhydrazinbehandlung, die im Laufe der folgenden 10 Tage langsam abklang.

Bei der Testung der erythropoetischen Aktivität des Serums der anämischen Kaninchen an der polycythämischen Maus ergab sich in Abhängigkeit vom Grad der Anämie ein Anstieg des Erythropoetinspiegels.

DISKUSSION

Es kann als unanfechtbare Tatsache angesehen werden, daß der Organismus stets bestrebt ist, Abbau und Neubildung der Blutzellen in einem Gleichgewicht zu halten. Zentralnervöse und humorale Einflüsse wurden für die Steuerung der Hämatopoese verantwortlich gemacht. Der Wirkungsmechanismus dieses Regulationssystems ist jedoch lange Zeit ein Objekt heftiger Diskussionen gewesen.

Als erster formulierte MIESCHER (6) 1893 die Theorie, daß die Anoxie des Gewebes die Erythrocytenproduktion stimuliere. Seitdem haben die Ergebnisse zahlreicher Arbeiten diese Theorie bekräftigt, es konnte jedoch nicht geklärt werden, an welchem Organ sich der Sauerstoffmangel auswirkt und auf welchem Wege der Reiz zur Erythropoesesteigerung zum Knochenmark, dem Erfolgsorgan, gelangt. Es wurde angenommen, daß durch die Anoxie bzw. Hypoxie das Knochenmark zu einer erhöhten Erythrocytenproduktion stimuliert wird, indem sich die undifferenzierten Stammzellen in Erythroblasten umwandeln. Eine direkte Einwirkung des Sauerstoffmangels auf das Knochenmark konnte jedoch ausgeschlossen werden. Durch lokale Anoxie ließ sich keine Markhyperplasie auslösen. Auch konnte im Knochenmark amputierter

Extremitäten bei Gefäßerkrankungen mit ausgeprägter Ischämie keine Erythropoese Steigerung nachgewiesen werden (SUGERMAN). In Knochenmarkkulturen ließ sich sogar bei erniedrigtem Sauerstoffdruck eine Hemmung der Erythroblastenproliferation feststellen (BERNADELLI). Ähnliche Beobachtungen machten STOHLMAN u. BRECHER am lebenden Versuchstier in der Unterdruckkammer. Die bei Aufenthalt in großen Höhen einsetzende reaktive Erythropoese Steigerung ließ in sehr großen Höhen (8000 m) wieder nach, da infolge der stark abgesunkenen O_2 -Spannung im Knochenmark eine Hemmung der Erythroblastenteilung resultiert.

Im Gegensatz zu MIESCHER vertraten CARNOT u. DEFLANDRE die Auffassung, daß die Neubildung der roten Blutkörperchen durch einen im Blut kreisenden Wirkstoff stimuliert wird, den sie Hämopoetin nannten. Dieser Plasmakfaktor gewann erneut an Interesse, als es REISSMANN im Parabioseversuch gelungen war, durch Hypoxie des einen Partners bei beiden Parabiosetieren eine Erythropoese Steigerung auszulösen. Es war somit der Beweis erbracht, daß sich der Sauerstoffmangel nicht direkt, sondern durch Vermittlung eines humoralen Blutfaktors auf das Knochenmark auswirkt.

Es wird heute allgemein angenommen, daß die Erythropoese wenigstens teilweise durch diesen humoralen Mechanismus gesteuert wird. In Übereinstimmung mit BONSDORFF u. JALAVISTO wird der vermutete Faktor Erythropoetin genannt, da er lediglich die Erythropoese beeinflusst. Seine chemische Natur ist noch nicht restlos aufgeklärt. JACOBSON, CUNEY u. GOLDWASSER vermuten, daß es sich um ein α -2-Glykoprotein handelt, das wahrscheinlich in der Niere gebildet oder aktiviert werden soll.

Bei unseren Bemühungen, das Problem zu klären, ob bei Zuständen gesteigerter Erythropoese vermehrt Erythropoetin verbraucht wird, haben wir Phenylhydrazin benutzt, um eine schwere Anämie zu erzeugen und einen hohen Erythropoetintiter zu erhalten. Diese Vorbehandlung der Versuchstiere ist wirksamer als Blutentzug durch Aderlaß (JACOBSON 14). Daß die Phenylhydrazin-hämolyse einen stimulierenden Einfluß auf das erythropoetische System des Kaninchens ausgeübt hat, beweisen der starke Retikulozytenanstieg (siehe Tabelle 2 und 2a) und die Vermehrung der Erythroblasten im Knochenmark der Versuchstiere nach Beendigung der Phenylhydrazininjektionen (siehe Tabelle 4). Während der ersten 4 Tage post injectionem sind die roten Vorstufen im Knochenmark exzessiv vermehrt und durchlaufen während dieser Zeit ihren Reifungsprozeß bis zum Stadium der Retikulozyten. Danach sinken mit zunehmender Besserung der Anämie die Erythroblastenwerte langsam ab, sind aber am 10. Tag post injectionem noch nicht völlig normalisiert.

Bekanntlich vollziehen sich Teilung und Reifung der roten Vorstufen in gesetzmäßiger Weise. Der Proerythroblast regeneriert in einem 24-Stunden-Rhythmus unentwegt seine Kern- und Plasmamasse, indem durch eine hemihomoplastische Teilung 2 Erythroblasten entstehen, von denen der eine sein Kern- und Plasmavolumen bis zur Größe des Proerythroblasten verdoppelt, während der andere in 3 succedaneen Reifeteilungen 8 Normoblasten bildet. Dieser 4 Tage dauernden Reifung bis zum Retikulocyten folgt das Stadium des reifen Erythrocyten, der durch seine Ausstattung mit Hämoglobin und einem hochdifferenzierten Fermentapparat für die Aufgabe des Sauerstofftransportes besonders geeignet ist.

ERSLEV nimmt an, daß die Rate der Erythrocytenneubildung vom Sauerstoffbedarf der Gewebe reguliert wird, indem unter der Einwirkung des im Blut kreisenden Erythropoetins eine Differenzierung der primitiven undifferenzierten Mesenchymzelle in Erythroblasten erfolgt (ALPEN 14, STOHLMAN 32). Für diese Theorie spricht auch die Beobachtung von JACOBSON (15 u. 16), der bei übertransfunden polycythämischen Mäusen mit nahezu völliger Hemmung der Erythropoese durch Injektion erythropoetinhaltigen Plasmas eine Erythroblastenproliferation auslösen konnte.

In der Tat lassen die eigenen Versuchsergebnisse kaum eine andere Deutung zu. Das Erythropoetin scheint eine Differenzierung der Stammzellen zu Proerythroblasten zu bewirken, die bei erhöhtem Erythropoetinspiegel insgesamt vermehrt sind und in gleicher Weise wie die Retikulocyten als Maß für die erythropoetische Aktivität des Plasmas angesehen werden können.

GOLDWASSER (15) hat gezeigt, daß die polycythämische Maus das ideale Versuchstier für die Erythropoetintestung ist, da durch einen einfachen, nicht toxischen physiologischen Mechanismus die Erythropoese weitgehend gedrosselt werden kann, so daß die Retikulocyten fast vollständig aus dem peripheren Blut verschwinden und im blutbildenden Gewebe kaum noch Erythroblasten vorhanden sind. Da durch Erythropoetininjektionen diese Erythropoesehemmung durchbrochen wird, kann anhand des Retikulocytenanstiegs die Erythropoetinaktivität des injizierten Serums getestet werden.

Daß tatsächlich eine Hemmung der Erythropoese durch Übertransfusion bei der Maus erzielt werden kann, beweisen die Retikulocytenwerte der Testmäuse vor Injektion des Kaninchenserums (Tabelle 5). Meist sind nach 4-maliger intraperitonealer Injektion der Spendererythrocyten die Retikulocyten der Testmäuse vollständig aus dem peripheren Blut verschwunden. Bei einigen Tieren fanden sich 1 bis maximal 2,4 ‰ Retikulocyten. Nach Injektion des

zu testenden Kaninchenserums erfolgte regelmäßig ein deutlicher Anstieg, wobei Werte von 40 bis 50 % erreicht wurden, während bei der Kontrollgruppe, die lediglich normales Kaninchenserum erhielt, der Retikulozytenanstieg im Durchschnitt 9 % betrug. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß das Serum der anämischen Kaninchen eine hohe erythropoetische Aktivität besitzt, die 6 bis 7 Tage nach der Phenylhydrazinhämolyse nahezu unverändert bleibt und erst dann geringer wird, wenn infolge der gesteigerten Erythropoese die Erythrocyten auf etwa 4 Millionen angestiegen sind. Der erhöhte Erythropoetinspiegel bleibt so lange nachweisbar, bis eine vollständige Normalisierung des roten Blutbildes eingetreten ist. Erst dann sinkt er zur Norm ab und kann nur nach 6- bis 10-facher Konzentration des normalen Plasmas im biologischen Test nachgewiesen werden (GORDON).

Es besteht keine einheitliche Auffassung über die Rolle des Erythropoetins bei der Regulierung der Erythropoese. JACOBSON u. Mitarb. nehmen an, daß die Erythrocytenneubildung durch einen einzigen erythropoetischen Faktor im Plasma stimuliert wird, während LINMAN u. BETHELL zwei Faktoren für erforderlich halten, von denen der hitzestabile, ätherlösliche lediglich die Erythroblastenproliferation steigert, während der thermolabile, in Äther unlösliche, für die Hämoglobinsynthese verantwortlich sein soll. PRENTICE u. MIRAND sowie JACOBSON u. Mitarb. konnten allerdings die Befunde von LINMAN u. BETHELL bei Nachprüfungen nicht bestätigen und halten weiterhin einen einzigen erythropoetischen Faktor für ausreichend.

Erythropoetintestungen von Patientenserum ergaben bei stärkergradigen Anämien stets eine erhöhte Erythropoetinaktivität. Allerdings verlief die Höhe des Erythropoetinspiegels nicht immer dem Schweregrad der Anämie parallel. Diese Schwankungen wurden auf methodische Fehler bezogen, zumal der biologische Test an der hypophysektomierten Ratte oder polycythämischen Maus nicht empfindlich genug ist, um geringgradige Steigerungen der Erythropoetinaktivität zu erfassen. Nachdem jedoch von GURNEY, JACOBSON u. GOLDWASSER darauf hingewiesen worden war, daß die größte Erythropoese Steigerung des Testtieres durch Serum erzielt werden konnte, das von Patienten mit hypoplastischer oder aplastischer Anämie stammte, ergab sich die Frage, ob die Erhöhung des Erythropoetinspiegels im Blut dieser Patienten mit der fehlenden Erythroblastenvermehrung des Knochenmarkes in ursächlichem Zusammenhang steht und ob nicht umgekehrt bei gesteigerter Erythropoese vermehrt Erythropoetin verbraucht wird und dadurch der Blutspiegel dieses Wirkstoffs absinkt.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, vor allem diese Frage zu klären. Zu diesem Zwecke wurde der Zustand der Erythropoese nach einer durch Phenylhydrazin induzierten Hämolyse verfolgt und gleichzeitig nach Kenntnis des Knochenmark- und Blutbildes der betreffenden Kaninchen die Testung des Serums dieser anämischen Versuchstiere auf seine erythropoetische Aktivität an der polycythämischen Maus vorgenommen. Hierbei ergab sich, daß in den ersten Tagen nach der Phenylhydrazinhämolyse, also zum Zeitpunkt der größten Erythropoesesteigerung des Knochenmarkes das Serum die höchste Erythropoetinaktivität aufwies. Es bestand also eine annähernd lineare Abhängigkeit des Erythropoetinspiegels von dem Grad der Erythroblastenvermehrung im Knochenmark, wobei hohe Erythroblastenwerte einem hohen Erythropoetintiter entsprachen, während bei geringgradiger Erythroblastenproliferation der Erythropoetinspiegel ebenfalls nur gering erhöht war. Aufgrund der erhobenen Befunde konnte somit für die durch Phenylhydrazinhämolyse beim Kaninchen ausgelöste Anämie eine vermehrte Erythropoetinproduktion nachgewiesen werden, die sich der Erythropoesesteigerung proportional verhält und erst dann geringer wird, wenn der Erythrocytenverlust durch die neugebildeten roten Blutkörperchen weitgehend ausgeglichen ist. Für einen vermehrten Verbrauch von Erythropoetin durch die Erythroblastenproliferation und ein dadurch bedingtes Absinken des Erythropoetinspiegels ergab sich kein Anhalt.

ZUSAMMENFASSUNG

20 Kaninchen wurden durch Phenylhydrazininjektionen anämisch gemacht und in täglichem Abstand je 2 Tiere getötet, denen Blut zur Erythropoetintestung an der polycythämischen Maus entnommen wurde. Gleichzeitig wurde der jeweilige Zustand der Erythropoese durch Blutbild- und Knochenmarkuntersuchungen bestimmt. Hämoglobin- und Erythrocytenwerte verhielten sich etwa 4 Tage konstant und stiegen vom 5. Tage an allmählich an. Umgekehrt blieben die Retikuloeyten etwa 4 Tage vermehrt und verminderten sich mit zunehmendem Erythrocytenanstieg. In ähnlicher Weise zeigte das Knochenmark in den ersten Tagen eine starke Erythroblastenvermehrung, die langsam geringer wurde.

Es bestand eine annähernd lineare Korrelation zwischen Erythroblastenproliferation und Steigerung der Erythropoetinaktivität. Für einen vermehrten Verbrauch von Erythropoetin durch die Erythroblasten und dem daraus resultierenden Absinken des Erythropoetinspiegels ergab sich kein Anhalt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBRECHT, M. : zit. nach Friederici.
2. BERNADELLI, L. : Acta haemat. 22, 90 (1959).
3. BONSDORFF, E. und E. JALAVISTO: Acta Physiol. Scand. 16, 150 (1948).
4. BOORSOK, H., A. GRAY-BIEL, G. KEIGHLEY and R. WINDSOR: Stimulation of Erythropoiesis in normal adult rats by a non-protein extract of plasma of anemic rabbits, Joint Research Report, U. S. Naval School of Aviation Medicine, 1-7, 1953.
5. BORSOOK, H., A. GRAY-BIEL, G. KEIGHLEY and R. WINDSOR: Polycythemic response in normal adult rats to a non-protein plasma extract from anemic rabbits. Blood 9, 734 (1954).
6. CARNOT, P. und C. DEFLANDRE: C. R. Acad. Sci., Paris, 143, 384 (1906).
7. CESARIS-DEMEI: zit. nach Friederici.
8. COUTELLE, RAPOPORT und LINDIGKEIT: zit. nach Friederici.
9. DUSTIN, P. : zit. nach Friederici.
10. DUESBERG, R. : zit. nach Friederici.
11. ERSLEV, A. J. : Humoral regulation of red cell production. Blood 8, 734 (1954).
12. ERSLEV, A. J. : Physiological control of red cell production. Blood 10, 954 (1955).
13. ERSLEV, A. J. : Observations on the nature of the Erythropoietic Serum Factor. J. of Lab. and Clinical Medicine 50, 543 (1957).
14. ERSLEV, A. J. : The effect of anemic anoxia on the cellular development of nucleated red cells. Blood 14, 386 (1959).
15. FINCH, C. A., M. L. HANSON and D. M. DONOHUE: Kinetics of erythropoiesis. A comparison of response to anemia induced by phenylhydrazine and by blood loss. American J. of Physiol. 4, 761 (1959).
16. FRESEN, O. und W. TISCHENDORF: zit. nach Friederici.
17. FRIED, W., L. F. PLZAK, L. O. JACOBSON and E. GOLDWASSER: Studies on Erythropoiesis III. Factors controlling erythropoietin production. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 94, 237 (1957).

18. FRIEDERICI, L. : Der Erythrocyt.
Dr. A. Hüthig-Verlag, Heidelberg 1958.
19. FRIEDERICI, L. und E. F. GERSMEYER: Erythropoetin.
Die Medizinische 1960, 2669.
20. GORDON, A. S., S. J. PILI- A plasma extract with Erythropoietic acti-
ERO, W. KLEINBERG and vity. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 86,
H. FREEDMAN: 255 (1954).
21. GRANT, W. C. : The influence of anoxia of lactating rats
and mice on blood of their normal offspring.
Blood 10, 334 (1954).
22. GURNEY, C. W., C. PAN, Studies on Erythropoiesis IV. Erythropoietin
and E. GOLDWASSER: in Human Plasma. J. of Lab. and Clinical
Med. 50, 534 (1957).
23. GURNEY, C. W. and Studies on Erythropoiesis IX. Mechanism
C. PAN: of decreased erythropoiesis in experimental
polycythemia. Proc. Soc. Exper. Biol. and
Med. 98, 789 (1958).
24. GURNEY, C. W., N. WACK- Studies on Erythropoiesis XVII. Some
MAN and E. FILMANOWICZ: quantitative aspects of the Erythropoietic
Response to Erythropoietin. Blood 18, 531
(1961).
25. JACOBSON, E. M., A. K. Relative effectiveness of phenylhydrazine
DAVIS and E. L. ALPEN: treatment and hemorrhage in the produc-
tion of erythropoietic factor. Blood 11, 937
(1956).
26. JACOBSON, L. O., E. GOLD- Studies on Erythropoiesis IV. Reticulocyte
WASSER, L. PLZAK and response of hypophysectomized and poly-
W. FRIED: cythemic rodents to erythropoetin.
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 94, 243
(1957).
27. JACOBSON, L. O., E. GOLD- Transfusion induced Polycythemia as a
WASSER and C. W. GURNEY: model for studying factors influencing Ery-
thropoiesis. Ciba Foundation Symposium
on Haemopoiesis 1960, 423. London.
28. HEILMEYER, L. : Handbuch der inneren Medizin. Bd. II,
Springer-Verlag 1951.
29. KEICHEY, C., F. LOWY, A cooperative essay of a sample with Ery-
H. BORSOOK, E. GOLDWAS- thropoietic stimulating activity. Blood 16,
SER, A. S. GORDON, T. PREN- 1424 (1960).
TICE, W. RAMBACH, F.
STOHLMAN and D. C. Van DYKE:

30. KRACJE, R. R. : Diseases of the Blood. Philadelphia, J. B. Lippincott Co., 1941.
31. KRUMBHAAR, E. B. and A. J. CHANUTIN: Studies in experimental plethora in dogs and rabbits. J. Exper. Med. 35, 847 (1922).
32. LAMMERTON, L. F., E. H. BELCHER and E. B. HARRISS: Blood uptake of Fe⁵⁹ in studies of red cell production. Kinetics of Cellular Proliferation, New York, Grune and Stratton, 1957.
33. LINMAN, J. W., F. H. BETHELL and M. J. LANG: Studies on the nature of the plasma erythropoietic factor. J. Lab. and Clinical Med. 51, 8 (1958).
34. LOESCHKE, H. H. : Über die humorale Steuerung der normalen Erythrozytenbildung. Ztschr. Vitamin- Hormon- u. Fermentforsch. 3, 346 (1949-1950).
35. LOWEY, P. H., C. KEIGHLEY, H. BORSOOK and A. GRAYBIEL: On the Erythropoetic principle in the blood of rabbits made severely anemic with Phenylhydrazine. J. of Haematology 3, 262 (1959).
36. NAETS, J. P. : Experientia 14, 74 (1958).
37. NAETS, J. P. : Nature 181, 1134 (1958).
38. PLZAK, L. F., E. FRIED, L. O. JACOBSON and W. F. BETHARD: Demonstration of stimulation of Erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe⁵⁹. J. Lab. and Clinical Med. 46, 671 (1955).
39. PLZAK, L. F., L. O. JACOBSON and E. GOLDWASSER: Erythropoiesis II. Assay of erythropoieting in hypophysectomized rats. Blood 12, 203 (1956).
40. PRENTICE, T. C. and E. A. MIRAND: Blood 12, 993 (1957).
41. REICHLIN, M. and J. HARRINGTON: Erythropoetin I. Demonstration of Erythropoetin in Normal Plasma. Blood 16, 1298 (1960).
42. REISSMANN, K. H. : Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. Blood 5, 372 (1950).
43. REISSMANN, K. H., T. NOMURA, R. W. GUNN and F. BROSIUS: Erythropoietic response to anemia or erythropoetin injections in uremic rats with or without functioning renal tissues. Blood 16, 1411 (1960).
44. ROBERTSON, O. H. : The effects of experimental plethora on blood production. J. of Exper. Med. 29, 221 (1917).

45. ROHR, K. : Das menschliche Knochenmark.
Thieme-Verlag 1959.
46. RUHENSTROTH-BAUER, G. : zit. nach Friederici.
47. SCHERMER, S. : Die Blutmorphologie der Laboratoriums-
tiere. Johann Ambrosius Barth-Verlag,
Leipzig (Germany), 1954.
48. SCHILLING, V. : zit. nach Friederici.
49. SMITH, Th. : zit. nach Friederici.
50. STOHLMAN, F., C. ROTH Evidence for a humoral regulation of ery-
and J. C. ROSE: thropoiesis. Blood 9, 721 (1954).
51. STOHLMAN, F. : Observations on the changes in the kinetics
of red cell proliferation following irradi-
ation and hypertransfusion. Blood 16, 1777
(1960).
52. SUGERMAN: Med. Z. Australia 2, 913 (1956).
53. Van DYKE, D. C., M. MAY- Relation between severity of anemia and
RISSE, J. LAWRENCE, erythropoetin titer in human beings.
J. F. GARCIA and Blood 20, 178 (1962).
M. POLLYCONE:
54. VOIT, K. : zit. nach Friederici.
55. WEICKER, H. : Das quantitative Gleichgewicht der Erythro-
poese. Klin. Wschr. 31, 637 (1953).
56. WEICKER, H. : Das Maß-, Mengen- und Zeitgefüge der
Erythropoese unter physiologischen und pa-
thologischen Bedingungen. Schweiz.med.
Wschr. 87, 1 (1957).
57. WINTROBE, M. : Clinical Haematology. Philadelphia,
Lea and Febiger 1956.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 15.10.1932 in New York City, New York, U.S.A., geboren. 1938 trat ich in die Volksschule (Elementary School) ein und besuchte anschließend die höhere Schule (McBurney School) in New York City, wo ich 1950 das Abitur bestand.

Von 1950 bis 1954 studierte ich am Union College, Schenectady, New York. Hier bestand ich die Abschlußprüfung als Bachelor of Science.

Von 1954 bis 1956 studierte ich an der Fordham University, Bronx, New York. 1956 habe ich mein Studium unterbrochen, als ich in New York die Vertretung für die pharmazeutische Firma "Wyeth" übernahm.

Dann nahm ich das schon vorher begonnene Medizinstudium am Union College 1958 wieder auf und setzte meine Studien in Deutschland an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz fort und bestand hier im April 1960 das Physikum. Die klinischen Semester absolvierte ich ebenfalls in Mainz. Ich beabsichtige, im Frühjahr 1963 das medizinische Staatsexamen abzulegen.

